

**CYTOMEGALIEVIRUS-INFEKTION
DER MAUS UNTER
CYTOSINARABINOSID-BEHANDLUNG**

Manfred Rath

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551907_0035

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. K. Betke

CYTOMEGALIEVIRUS-INFEKTION DER MAUS
UNTER CYTOSINARABINOSID-BEHANDLUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dr. Manfred Rath
aus
Reppen
München 1975

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Otmar Goetz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Klaus Betke

Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 1.7.1975



Inhaltsangabe

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	2
2.1. <u>Cytomegalie</u>	2
2.1.1. Erreger	2
2.1.2. Pathogenese und Krankheitsbild	2
2.1.3. Diagnose	3
2.2. <u>Behandlung der Cytomegalie mit</u> <u>Cytosinarabinosid</u>	4
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	7
3.1. <u>Material und Methodik</u>	7
3.1.1. Mäuse	7
3.1.2. Virus	7
3.1.3. Medium	7
3.1.4. Zellkulturen	8
3.1.5. Overlay	9
3.1.6. Organsuspension	9
3.1.7. Plaque-Test	9
3.1.8. Hämagglutinierende und hämolysierende Antikörper gegen Schafererythrocyten	10
3.1.9. Komplementbindende Antikörper gegen Mäusecytomegalievirus	11
3.1.10. Cytosinarabinosid	11
3.1.11. Versuchsordnung	11
3.1.11.1. Nachweis von hämagglutinierenden und hämolysierenden Antikörpern gegen Schafererythrocyten unter Cytosin- arabinosidbehandlung	11
3.1.11.2. Prüfung der Mortalität unter Cytosinarabinosidbehandlung	12

	Seite
3.1.11.3. Bestimmung der Viruskonzentration in der Leber unter Cytosinarabinosid- behandlung	13
3.1.11.4. Nachweis von komplementbindenden Antikörpern gegen Mäusecytomegalie- virus unter Cytosinarabinosidbehandlung	13
3.2. <u>Ergebnisse</u>	14
3.2.1. Nachweis von hämagglutinierenden und hämolysierenden Antikörpern gegen Schafer erythrocyten unter Cytosin- arabinosidbehandlung	14
3.2.2. Prüfung der Mortalität unter Cytosinarabinosidbehandlung	15
3.2.3. Bestimmung der Viruskonzentration in der Leber unter Cytosinarabinosid- behandlung	20
3.2.4. Nachweis von komplementbindenden Antikörpern gegen Mäusecytomegalie- virus unter Cytosinarabinosid- behandlung	22
3.3. <u>Diskussion</u>	25
4. ZUSAMMENFASSUNG	27
5. LITERATURVERZEICHNIS	28

Herrn Prof. Dr. med O. G o e t z möchte ich
für die Überlassung des Themas, sowie für die
wertvollen Hinweise zur Erstellung der Arbeit
danken.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. P. P e l l e r
gilt mein Dank für die jederzeit gewährte
hilfreiche Unterstützung.

Frl. H. N i c k e l , Fr. G. S e i f r i e d
und Frl. R. S t e l l m a c h sei für die
freundliche Mithilfe bei der praktischen Durch -
führung der Untersuchungen gedankt.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung
der Friedrich-Baur-Stiftung durchgeführt.

1. Einleitung

Zur Behandlung von Viruserkrankungen gibt es im Gegensatz zu Infektionen durch zelluläre Mikroorganismen keine spezifischen Therapeutika. Dementsprechend muß man sich auf symptomatische Maßnahmen beschränken.

Eine erste günstige Entwicklung zeichnet sich bei Herpes-simplex-Infektionen der Haut durch den Einsatz von Tromantadin und Idoxuridin ab. Der entscheidende Nachteil dieser Substanzen besteht darin, daß sie nur lokal eine antivirale Wirksamkeit entfalten.

Zur systemischen Behandlung von Viren aus der Herpes-Gruppe, wie Herpes-simplex-, Herpes-zoster- und Cytomegalievirus, wird seit kurzem Cytosinarabinosid empfohlen (6,7,8,15,17,18, 20,25,28).

Die Aufgabe dieser Arbeit war es im Tierexperiment die Wirksamkeit von Cytosinarabinosid auf den Verlauf der Cytomegalievirus-Infektion der Maus zu überprüfen.

2. Literatur

2.1. Cytomegalie

2.1.1. Erreger

Das Cytomegalievirus ist der Erreger der gleichnamigen Krankheit. Es ist ein mittelgroßes DNS-Virus und wird zur Herpes-Gruppe gerechnet. Die Benennung Cytomegalie nimmt Bezug auf die Tatsache, daß sich virusinfizierte Zellen bis auf einen Durchmesser von 30μ vergrößern können. An sich kennt man beim Menschen nur ein Cytomegalievirus. Die einzelnen Stämme sind jedoch serologisch uneinheitlich und man unterscheidet heute drei antigendifferente Stämme. Das Cytomegalievirus läßt sich auf menschlichen Fibroblastenzellkulturen züchten. Es bildet einen zytopathischen Effekt, der sich schon nach 24-48 Stunden nachweisen läßt. Eine vollständige Zelldegeneration erfolgt innerhalb 8 - 10 Tagen.

2.1.2. Pathogenese und Krankheitsbild

Bei der Übertragung des Erregers muß man einen intrauterinen und einen postnatalen Infektionsweg unterscheiden. Beim intrauterinen erfolgt die Infektion des Föten transplazentar, wobei eine Virämie der Mutter die Voraussetzung bildet. Postnatale Infektionen sind möglich, weil infizierte Personen das Virus über Monate mit dem Urin, aber auch pharyngeal ausscheiden. Wesentlich bei der Cytomegalie ist die Tatsache, daß Infektion nicht Erkrankung bedeutet. Die Zahl der latent Infizierten ist ungleich größer als die Zahl

der manifest Erkrankten.

Die konnatale Cytomegalie gilt heute als die häufigste transplazentar übertragene Infektionskrankheit. Bei etwa 1 % aller Neugeborenen kann eine Virusausscheidung nachgewiesen werden. Von den Ausscheidern wiederum erkranken etwa 5 % an Cytomegalie. Sie tritt dann fast immer generalisiert auf. Lokalisierte Erkrankungen sind selten. Bei der generalisierten Form steht die Hepatosplenomegalie mit Ikterus im Vordergrund. Zahlenmäßig folgen Veränderungen im ZNS, häufig ausgesprochene Mikrozephalie. Man beobachtet ferner Anämie, Thrombozytopenie, Chorioretinitis und Pneumonien.

Postnatale Infektionen erzeugen in den ersten Lebensjahren Krankheitsbilder, die sich weitgehend mit denen der konnatalen Form decken. Erscheinungen von seiten des Respirationstraktes und der Leber stehen im Vordergrund. In späteren Lebensjahren erkranken fast ausschließlich Personen mit gestörtem immunologischen Geschehen. Häufig findet man das Virus bei therapeutischer Immundepression. Meistens sind nur einzelne Organe befallen. Man unterscheidet hepatische, cerebrale und seltener respiratorische Verlaufsformen.

2.1.3. Diagnose

Für die Diagnose war vor Einführung der Zellkulturtechnik in die Routinediagnostik der Nachweis von Zellen mit intranukleären Einschlusskörperchen, den sog. Eulenaugenzellen aus Urin, Speichel oder Liquor wichtig. Heute wird die Ätiologie meistens verifiziert durch den Virusnachweis auf Gewebekulturen, auf die

Urin oder Rachenabstriche verimpft wurden. Abgesehen von dem Erregernachweis beruht das Schwergewicht der Diagnostik auf dem Nachweis komplimentbindender Antikörper im Serum.

2.2. Behandlung der Cytomegalie mit Cytosinarabinosid

BUTHALA (4) konnte die virostatistische Wirkung von Cytosinarabinosid erstmals 1964 gegen eine Reihe von DNS-Viren nachweisen. In vitro Untersuchungen von EMÖDI und VACI (8,34) bestätigten die antivirale Aktivität auch gegen das Cytomegalievirus.

Cytosinarabinosid hemmt in vitro die Replikation von DNS-Viren, besonders aus der Herpes-Gruppe, durch Blockierung der DNS-Synthese. Dabei wird Cytosinarabinosid durch Phosphorylierung aktiviert und in Cytosinarabinosid-Diphosphat und Cytosinarabinosid-Triphosphat überführt. Die Diphosphatverbindung hemmt die Reduktion von Cytidin-Diphosphat zu Desoxycytidin-Diphosphat, während das Triphosphat die DNS-Polymerase inhibiert. Außerdem scheint eine direkte Inkorporation in Desoxyribonukleinsäure die Synthese zu verhindern (4,7,27,34).

Trotz der Nebenwirkungen von Cytosinarabinosid, im besonderen der Knochenmarksdepression, erscheint ein Einsatz bei der prognostisch oft ungünstig verlaufenden konnatalen Cytomegalie gerechtfertigt und erfolgversprechend. Es wurde daher bei an Cytomegalie erkrankten Kindern beiderlei Geschlechts im Alter von 1 - 22 Monaten eingesetzt.

In den klinischen Berichten schwanken die Dosen zwischen 2 mg/kg/die und 15 mg/kg/die Cytosin - arabinosid. Die Applikation erfolgt meist intravenös, doch auch intramuskulär wird es verabfolgt. Die Tagesdosis wird entweder kontinuierlich über den Tag verteilt infundiert oder auf zwei Injektionen im 12-Stunden-Abstand aufgeteilt oder in einer Injektion gegeben. Meistens gibt man Cytosinara - binosid in einem Block von mehreren Tagen. Die Angaben hierzu schwanken zwischen 3 und 15 Tagen. Bei längerer täglicher Medikation muß meist um den 8. Tag wegen der Nebenwirkungen seitens des Knochenmarks die Behandlung unterbrochen oder ganz eingestellt werden. McCracken gab Cytosinara - binosid in 2 bis 3 mehrere Tage dauernden Blöcken mit mehrtägigen Cytosinarabinosid-freien Intervallen (7,8,18,25).

Die Ergebnisse beim klinischen Einsatz von Cytosinarabinosid sind jedoch uneinheitlich. Plotkin erzielte deutliche Erfolge, während bei McCracken, Emödi und Kraybill Cytosinarabinosid in der Therapie versagte (7,8,18,25).

Es schien daher nützlich zu sein, im Tierversuch die Wirkung von Cytosinarabinosid auf die Cytomegalie-Virusinfektion zu überprüfen.

Wegen der strengen Artspezifität kann das humane Cytomegalievirus nicht verwendet werden. Für die Untersuchungen wurde daher das Mäusecytomegalievirus (MCMV) genommen. Es ist in seinen biologischen und physikalischen Eigenschaften eng verwandt mit dem menschlichen Cytomegalievirus. Die von beiden Viren hervorgerufenen Erkrankungen

stimmen im Infektionsablauf gut überein (3,13).
Die vom Mäusecytomegalievirus hervorgerufene
Viruserkrankung stellt daher ein geeignetes
Modell zur Überprüfung von Fragen dar, die
bisher bei Cytomegalieinfektionen nicht gelöst
werden konnten.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methodik

3.1.1. Mäuse

Verwandt wurden erwachsene Mäuse beiderlei Geschlechts des Inzuchtstammes NMRI mit einem Gewicht von 28 - 33 g (Versuchstieranstalt Willi Gassner, 8741 Sulzfeld). Bis zu 10 Tiere wurden jeweils in Macralon-Käfigen gehalten. Die Ernährung erfolgte durch gepreßtes Fertigfutter und Wasser mittels Trinkflaschen ad libitum.

3.1.2. Virus

Zur Verimpfung kam Mäusecytomegalievirus, Stamm Smith (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U.S.A.). Dieses Virus löst bei 1-Tag-alten Saugmäusen eine tödlich verlaufende Erkrankung, bei erwachsenen Mäusen eine chronische, subklinische Infektion aus. In allen Versuchen wurde es zwischen der 20. - 30. Gewebekulturpassage verwendet.

Zur Überprüfung der Virulenz und zur Einstellung der Viruskonzentration für die einzelnen Verimpfungen, wurde es im Plaque-Test aus titriert. Im allgemeinen wurden Titer zwischen 10^6 - 10^7 PFU/ml (Plaque-bildende-Einheiten pro Milliliter) erreicht. Zur Verimpfung kam es mit einem Titer von 10^6 PFU/ml.

3.1.3. Medium

Als Grundsubstanz wurde Eagle's Minimal Essential Medium der Behring-Werke mit einem Zusatz von 0,8 % NaHCO_3 , 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin und 100 E/ml Penicillin G versehen. Wachstumsmedium wurde

10 % fetales Kälberserum, Erhaltungsmedium

2 % fetales Kälberserum zugesetzt.

3.1.4. Zellkulturen

Verwendet wurden Mäuseembryofibroblastenkulturen, die nach den Angaben von OSBORN (22) hergestellt wurden. Hierzu wurden einer frühträchtigen Maus unter sterilen Bedingungen die Embryonen entnommen und diese mittels einer Schere zerkleinert. Dem so gewonnenen Organmaterial wurden etwa 15 ml einer auf 37° C erwärmten 0,25 % igen Trypsinlösung (Difco 1 : 250) zugesetzt. Die Suspension wurde 10 min bei mäßiger Drehung mit dem Magnetrührer bewegt. Nach kurzem Abzentrifugieren und Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment mit 70 ml Wachstumsmedium aufgeschwemmt und in eine ROUX-Schale gebracht, die im Brutschrank bei 37° C inkubiert wurde. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt. Nach 3 - 4 Tagen war ein gleichmäßiger Zellrasen gebildet und das Wachstumsmedium konnte gegen Erhaltungsmedium ausgetauscht werden. Für die Untersuchungen wurden Subpassagen in Plastikfläschchen zwischen der 2. - 4. Passage verwendet. Zu diesem Zweck wurde aus einer Kulturflasche, in der sich der Zellrasen ausgebildet hatte, das Medium entfernt. Nach kurzzeitigem Zusatz von 20 ml erwärmter 0,25 % iger Trypsinlösung, wurde diese verworfen und die Flasche bei 37° C 5 - 10 min inkubiert. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden die Zeichen der Zellablösung abgewartet. Nach Zugabe von 140 ml Wachstumsmedium erhielt man durch wiederholtes Mischen eine Suspension von Einzelzellen. Von dieser Zellsuspension wurden je 7 ml auf ein Plastikfläschchen gegeben und bei 37° C inkubiert. Nach 3 - 4 Tagen konnten

die Kulturen für Materialverimpfungen verwendet werden.

3.1.5. Overlay

Methylcellulose, 4 000 Centipoises, der Firma Dow, Midland, Mich., U.S.A., wurde einmal in absolutem Äthylalkohol gewaschen und luftgetrocknet. 1,5 g der vorbehandelten Methylcellulose wurden in 50 ml destilliertem Wasser suspendiert und bei 121° C 20 min lang autoklaviert. Nach Abkühlen auf 4° C wurde doppelt konzentriertes Wachstumsmedium hinzu - gegeben und im Eisbad mit dem Magnetrührer bis zur vollständigen Durchmischung gerührt. Der 1,5 % ige Overlay ist glasklar, bei einer Temperatur von 4° C halbflüssig und bei 37° C fest (2,10).

3.1.6. Organsuspension

In einem Tenbrock-Blender (Bellco, Vineland, N.J., U.S.A.) wurde die Leber verrieben und mit Erhaltungsmedium auf eine 20 % ige Suspension eingestellt. Nach Zentrifugation (2 000 U/min, 5 min lang) wurden aus dem Überstand Verdünnungen von 10^{-1} und 10^{-2} angelegt und im Plaque-Test austitriert. Für jede Verdünnung wurden zwei Schälchen benutzt.

3.1.7. Plaque-Test

Einschichtige Zellrasen (Monolayer) von Mäuseembryo-fibroblastenzellen wurden in rechteckigen, verschließbaren Plastikfläschchen (Bellco, Vineland, N.J., U.S.A.) mit einer Bodenfläche von 40 mm x 65 mm angelegt. Nach Abgießen des Wachstumsmediums wurden die Kulturen mit 0,2 ml Virus- bzw. Gewebe -

suspension beimpft und 1 Std. im Brutschrank inkubiert. Nach Abgießen der Suspension wurde der Zellrasen einmal mit Erhaltungsmedium gewaschen und mit 7 ml gekühltem Overlay überschichtet. In infizierten Kulturen traten die ersten Plaques etwa am 3. Tag p.inf. auf und erreichten am 6. Tag einen Durchmesser von 0,2 bis 0,8 mm. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Plaques unter dem Inversionsmikroskop mit einer Vergrößerung von 1 : 36 gezählt. Im Gegensatz zu den Literaturangaben blieb das Präparat ungefärbt und der Overlay wurde nicht abgegossen (2,10). Zur Zählung diente ein auswechselbares, durchsichtiges Raster, welches unter die Kulturfläschchen gesteckt werden konnte.

Nach dem 6. Tag nahm die Zahl der Plaques nicht mehr zu, es vergrößerten sich nur die Durchmesser bis zu 2,5 mm. Die Viruskonzentration wird in Plaque-bildenden-Einheiten (PFU) pro Milliliter Gewebekulturmedium oder Gramm Leberhomogenisat angegeben.

3.1.8. Hämagglutinierende und hämolysierende Antikörper gegen Schafererythrocyten

Die Titerbestimmungen erfolgten nach der Methode von ADLER (1). Als Modifikation wurde eine Mikromethode benutzt (Microtiter System Cooke Engineering Comp., U.S.A.) mit folgenden Mengen und Konzentrationen:

0,025 ml Serumverdünnung und 0,025 ml 0,2 % ige Schafererythrocytensuspension für den Hämagglutinationstest und 0,025 ml Serumverdünnung, 0,025 ml 0,5 % ige Schafererythrocytensuspension, 0,025 ml Meerschweinchenkomplement 1 : 20 für den Hämolysintest.

Alle weiteren Versuchsbedingungen blieben unverändert.

3.1.9. Komplementbindende Antikörper gegen Mäusecytomegalievirus

Analog dem Nachweis komplementbindender Antikörper gegen das humane Cytomegalievirus (32) wurden die Titerbestimmungen gegen Mäusecytomegalievirus in einer Mikromethode durchgeführt (Microtiter System Cooke Engineering Comp., U.S.A.).

3.1.10. Cytosinarabinosid

Cytosinarabinosid (4-amino-1-(beta-D-arabino-furanosyl)-1H-pyrimidin-2-on) der Firma Mack Nachf., Illertissen, (ALEXAN^R) wurde intraperitoneal in Dosen von 30 mg/kg/die und 45 mg/kg/die injiziert.

3.1.11. Versuchsanordnung

3.1.11.1. Nachweis von hämagglutinierenden und hämolyisierenden Antikörpern gegen Schaf - erythrocyten unter Cytosinarabinosidbe - behandlung

3 Gruppen von je 10 erwachsenen Mäusen wurden durch intraperitoneale Injektion von 5×10^8 Schaferythrocyten immunisiert. Die Tiere der Gruppe 1 erhielten, einen Tag nach der Immunisierung beginnend, an fünf aufeinanderfolgenden Tagen jeweils täglich 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung. Diese Gruppe diente zur Kontrolle. Den Tieren der Gruppe 2 wurde im gleichen zeitlichen Ablauf täglich 30 mg/kg Cytosin - arabinosid, den Tieren der Gruppe 3 45 mg/kg Cyto - sinarabinosid, intraperitoneal injiziert.

Am 2., 5., 7., 9., 12. und 14. Tag nach der Immunisierung wurden den Tieren aller Gruppen durch retroorbitale Punktion Blutproben entnommen. Die Proben von jeweils zwei Tieren einer Gruppe wurden gepoolt.

3.1.11.2. Prüfung der Mortalität unter Cytosin - arabinosid - Behandlung

Zur Prüfung kamen 182 Mäuse in den Versuch. Es wurden 5 Gruppen gebildet.

1. Gruppe: 53 Tiere erhielten 10^6 PFU Mäuse - cytomegalievirus intraperitoneal. Mit dem auf die Infektion folgenden Tag beginnend, bekamen die Tiere an fünf aufeinanderfolgenden Tagen jeweils täglich 0,5 ml physiologische Kochsalz - lösung injiziert. Diese Tiere bildeten die Kontrollgruppe.

2. Gruppe: 50 Tiere erhielten 10^6 PFU Mäuse - cytomegalievirus intraperitoneal und mit dem auf die Infektion folgenden Tag beginnend, an fünf aufeinanderfolgenden Tagen jeweils täglich einmal 30 mg/kg Cytosinarabinosid appliziert.

3. Gruppe: 39 Tiere erhielten 10^6 PFU Mäuse - cytomegalievirus und mit dem auf die Infektion folgenden Tag beginnend, jeweils einmal täglich an fünf aufeinanderfolgenden Tagen 45 mg/kg Cytosinarabinosid injiziert.

Die Gruppen 4 und 5 dienten zur Prüfung der Mortalität von Cytosinarabinosid allein. 20 Tiere der Gruppe 4 bekamen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen 30 mg/kg und 20 Tiere der Gruppe 5 im zeitlich gleichen Ablauf 45 mg/kg Cytosinarabinosid einmal täglich. Alle Tiere wurden 14 Tage beobachtet.

3.1.11.3. Bestimmung der Viruskonzentration in der Leber unter Cytosinarabinosidbehandlung

In den Versuch kamen 140 Mäuse. Jedes Tier erhielt 10^6 PFU Mäusecytomegalievirus intraperitoneal injiziert.

Es wurden 3 Gruppen gebildet.

1. Gruppe: 50 Tiere erhielten am Tage nach der Infektion beginnend, an fünf aufeinanderfolgenden Tagen jeweils einmal täglich 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal (Kontrollgruppe).

2. Gruppe: 50 Tiere erhielten am Tage nach der Infektion beginnend, an den fünf folgenden Tagen, jeweils einmal täglich 30 mg/kg Cytosinarabinosid.

3. Gruppe: 40 Tiere bekamen im zeitlich gleichen Ablauf entsprechend zu den anderen Gruppen 45 mg/kg/die Cytosinarabinosid.

Am 4. und 6. Tag nach der Virusinoculation wurde ein Teil der Tiere getötet und die Lebern entnommen. Jeweils zwei Lebern einer Gruppe wurden gemeinsam homogenisiert und auf ihren Virusgehalt titriert.

3.1.11.4. Nachweis von komplementbindenden Anti - körpern gegen Mäusecytomegalievirus unter Cytosinarabinosidbehandlung

36 Mäuse kamen in den Versuch. Jedem Tier wurden 10^6 PFU Mäusecytomegalievirus intraperitoneal injiziert. Die Tiere waren auf drei Gruppen verteilt:

1. Gruppe: 12 Tiere erhielten einen Tag nach der Infektion beginnend, an fünf aufeinanderfolgenden

Tagen jeweils einmal täglich 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung (Kontrollgruppe).

2. Gruppe: 12 Tiere erhielten einen Tag nach der Infektion beginnend, an fünf aufeinanderfolgenden Tagen jeweils einmal täglich 30 mg/kg Cytosin - arabinosid.

3. Gruppe: 12 Tiere bekamen im zeitlich gleichen Ablauf entsprechend zu den anderen Gruppen jeweils 45 mg/kg/die Cytosinarabinosid an fünf Tagen.

Am 4., 6., 8., 11. und 14. Tag nach der Infektion wurden allen Tieren aus den drei Gruppen durch retroorbitale Punktion Blutproben entnommen. Die Blutproben von jeweils zwei Tieren einer Gruppe wurden gepoolt.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Nachweis von hämagglutinierenden und hämo - lysierenden Antikörpern gegen Schafer erythrocyten unter Cytosinarabinosidbehandlung

Wie die Abbildungen 1 und 2 zeigen, kommt es unter dem Einfluß von 5 maliger Gabe von Cytosinarabinosid zu einer Unterdrückung der immunologischen Primärantwort der Maus.

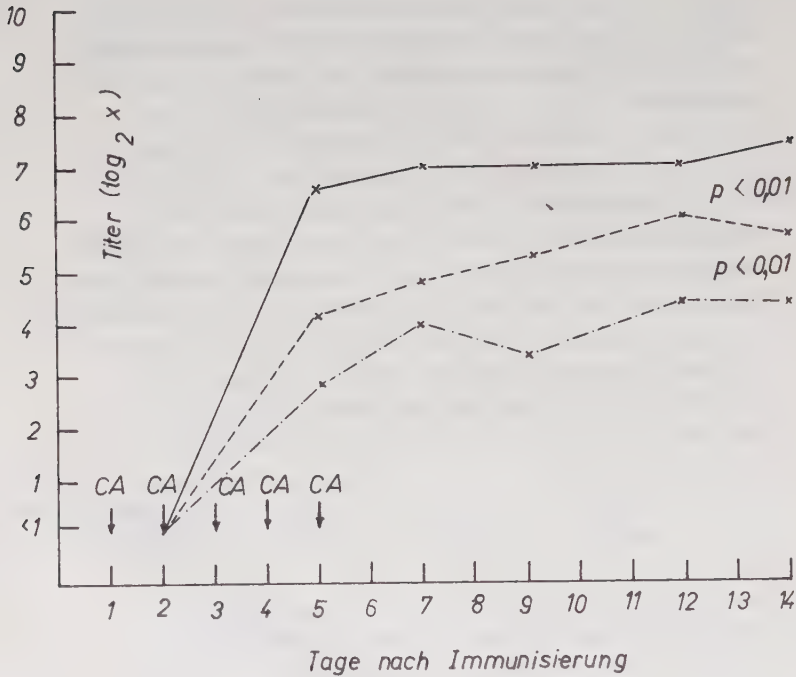
Die Titer hämagglutinierender und hämolysierender Antikörper gegen Schafer erythrocyten liegen bei den behandelten Gruppen immer deutlich unter den Kontrollen. Während der Cytosinarabinosid - Medikation und unmittelbar danach sind besonders hohe Titerdifferenzen zu sehen, die am deutlichsten bei den hämolysierenden Antikörpern mit fast drei Titerstufen ausgeprägt sind. Auch nach 14 Tagen,

d.h. neun Tage nach Absetzen von Cytosinarabinosid haben sich die Titer der behandelten Gruppen denen der Kontrollen nur unwesentlich genähert und liegen mindestens eine Titerstufe darunter.

Hämagglutinierende und hämolysierende Antikörper gegen Schaferythrocyten bilden sich deutlich dosisabhängig von Cytosinarabinosid aus. Alle Tiere der mit 45 mg/kg/die Cytosinarabinosid behandelten Gruppe weisen jeweils niedrigere Titer im Vergleich zu der Gruppe, die 30 mg/kg/die Cytosinarabinosid erhielt, auf. Die Dosis wirkt sich dabei auf die Verminderung der Antikörperbildung bei den hämagglutinierenden Antikörpern stärker aus.

3.2.2. Prüfung der Mortalität von Mäusecytomegalievirus-infizierten Mäusen unter Cytosinarabinosid

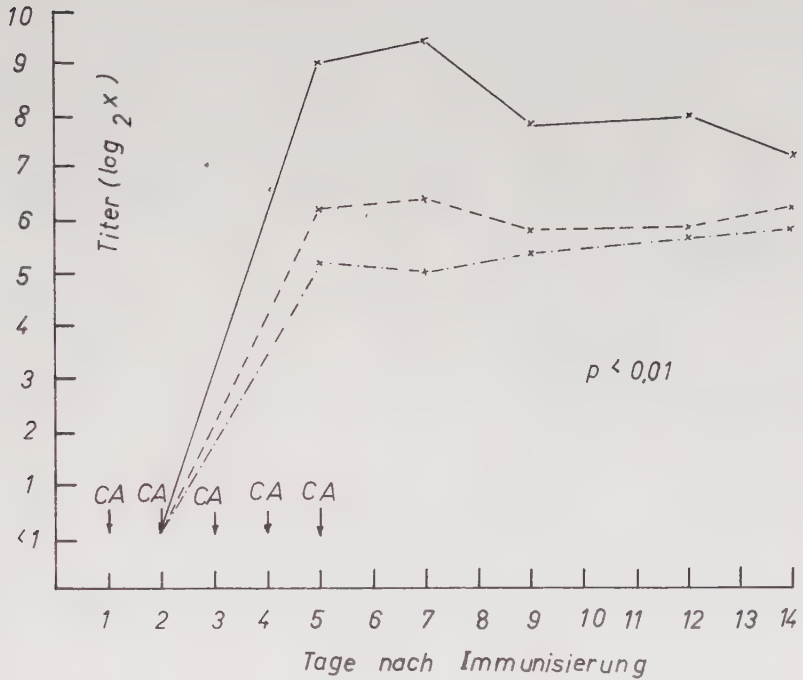
Alle Tiere, die Mäusecytomegalievirus (MCMV) und Cytosinarabinosid (CA) erhalten hatten, waren schwer krank. Sie zeigten deutliche Krankheits - anzeichen, wie herabgesetzte Aktivität, gesträubtes Fell, Freßunlust und starke Gewichtsabnahme. Eine Übersicht der Untersuchungsergebnisse vermittelt Tabelle 1 und Abbildung 3. Es starben aus der Gruppe 2, die MCMV und 30 mg/kg/die CA bekommen hatte, 9 Tiere. Dies entspricht einer prozentualen Mortalität von 18,0 %. Aus der Gruppe 3, der MCMV und 45 mg/kg/die CA injiziert worden war, starben 17 Tiere. Die Mortalität betrug somit 43,5 %. Von den Mäusen, die nur mit MCMV infiziert worden waren, verendeten 3,7 %. Es überlebten alle Tiere, die CA allein in einer Dosis von 30 mg/kg/die oder 45 mg/kg/die erhalten hatten.



Legende

- Gruppe 1 (Kontrolle)
- - - - Gruppe 2 (5x30 mg/kg CA)
- · - · - Gruppe 3 (5x45 mg/kg CA)

Abbildung 1. Einfluß verschieden hoher Dosen Cytosinarabinosid auf die Bildung hämagglutinierender Antikörper gegen Schafererythrocyten bei der Maus (CA : Cytosinarabinosid)



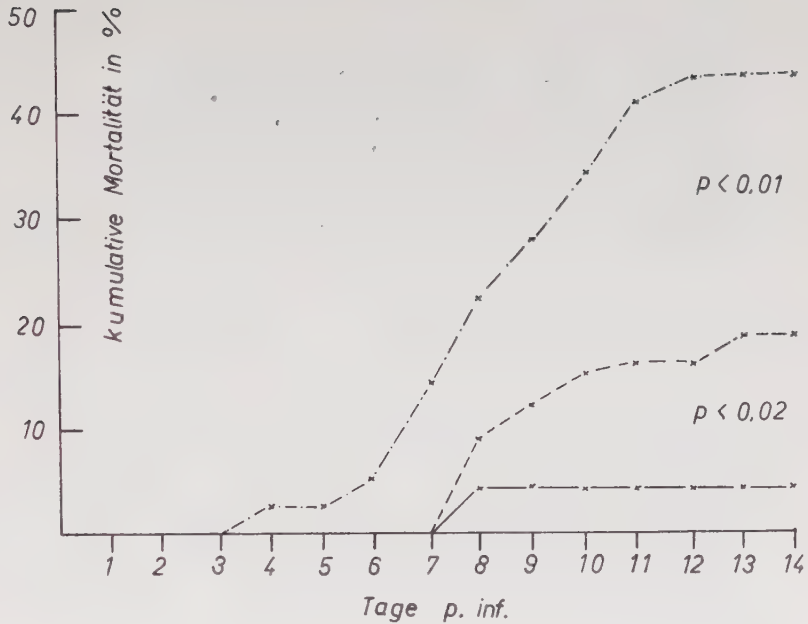
Legende

- Gruppe 1 (Kontrolle)
- - - Gruppe 2 (5x30 mg/kg CA)
- . - . Gruppe 3 (5x45 mg/kg CA)

Abbildung 2. Einfluß verschieden hoher Dosen Cytosinarabinosid auf die Bildung hämolysierender Antikörper gegen Schafererythrocyten bei der Maus (CA : Cytosinarabinosid)

Gruppe	Behandlung	Gesamtzahl der Tiere	Zahl der Gestorbenen	Prozent Mortalität
1. Gruppe	10 ⁶ PFU MCMV	53	2	3,7
	--			
2. Gruppe	10 ⁶ PFU MCMV	50	9	18,0
	5x30 mg/kg CA			
3. Gruppe	10 ⁶ PFU MCMV	39	17	43,5
	5x45 mg/kg CA			
4. Gruppe	--	20	0	0
	5x30 mg/kg CA			
5. Gruppe	--	20	0	0
	5x45 mg/kg CA			

Tabelle 1. Mortalität von Mäusecytomegalievirus -
infizierten Mäusen unter Cytosinarabinosid -
behandlung in verschieden hohen Dosen
(PFU : Plaque-bildende-Einheit,
MCMV : Mäusecytomegalievirus,
CA : Cytosinarabinosid)



Legende

- Gruppe 1 (10^6 PFU MCMV)
- - - Gruppe 2 (10^6 PFU MCMV + 5 x 30 mg/kg CA)
- . - . Gruppe 3 (10^6 PFU MCMV + 5 x 45 mg/kg CA)

Abbildung 3. Kumulative Mortalität von Mäusen nach Infektion mit Mäusecytomegalievirus und Behandlung mit Cytosinarabinosid (PFU : Plaque-bildende-Einheit, MCMV : Mäusecytomegalievirus, CA : Cytosinarabinosid)

Die Todesfälle traten in allen Gruppen zwischen dem 4. - 13. Tag p.inf. ein. Zwischen dem 7. - 11. Tag kommt es zu einer Häufung mit 85 % aller Sterbenden.

Bemerkenswert ist, daß bei den MCMV-infizierten Tieren, die mit der höheren Dosis Cytosinara - binosid behandelt worden waren, nicht nur deutlich mehr Tiere starben, sondern, daß die Todesfälle auch früher eintreten und die Mortalitätskurve steiler ansteigt.

3.2.3. Bestimmung der Viruskonzentration in der Leber unter Cytosinarabinosidbehandlung

Am 4. Tag p.inf. unterscheiden sich die Mittelwerte der Viruskonzentrationen in der Leber nur unwesentlich. So ergibt sich für die Kontrollgruppe ein mittlerer Titer von $24,9 \times 10^3$ PFU/Gramm Leber. In den behandelten Gruppen betragen die entsprechenden Titer für Gruppe 2 $34,9 \times 10^3$ PFU/Gramm Leber und in der Gruppe 3 $46,7 \times 10^3$ PFU/Gramm Leber.

Deutliche Unterschiede in der Viruskonzentration sind dagegen am 6. Tag p.inf. abzulesen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt. In der Kontrollgruppe sinkt die Viruskonzentration auf $12,5 \times 10^3$ PFU/Gramm Leber ab, während die Werte der behandelten Gruppen deutlich ansteigen. So ist der Virusgehalt in den Lebern der Gruppe 2 mit einem Mittelwert von $457,9 \times 10^3$ PFU/Gramm Leber etwa 35 mal größer und jener der Gruppe 3 mit $1004,9 \times 10^3$ PFU/Gramm Leber etwa 80 mal größer im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

PFU x 10 ³ pro Gramm Leberhomogenisat		
1. Gruppe	2. Gruppe	3. Gruppe
10 ⁶ PFU MCMV (Kontrolle)	10 ⁶ PFU MCMV 5x30 mg/kg CA	10 ⁶ PFU MCMV 5x45 mg/kg CA
4,5	320,0	1163,8
32,3	703,4	1210,0
3,7	457,8	1086,0
9,5	350,4	559,8
Mittelwert 12,5	457,9	1004,9

Tabelle 2. Viruskonzentration in der Leber am
6. Tag p.inf. bei Mäusecytomegalievirus-
infizierten Mäusen unter dem Einfluß
verschieden hoher Dosen Cytosinarabinosid
(PFU : Plaque-bildende-Einheit,
MCMV : Mäusecytomegalievirus,
CA : Cytosinarabinosid)

3.2.4. Nachweis von komplementbindenden Antikörpern gegen Mäusecytomegalievirus unter Cytosin - arabinosidbehandlung

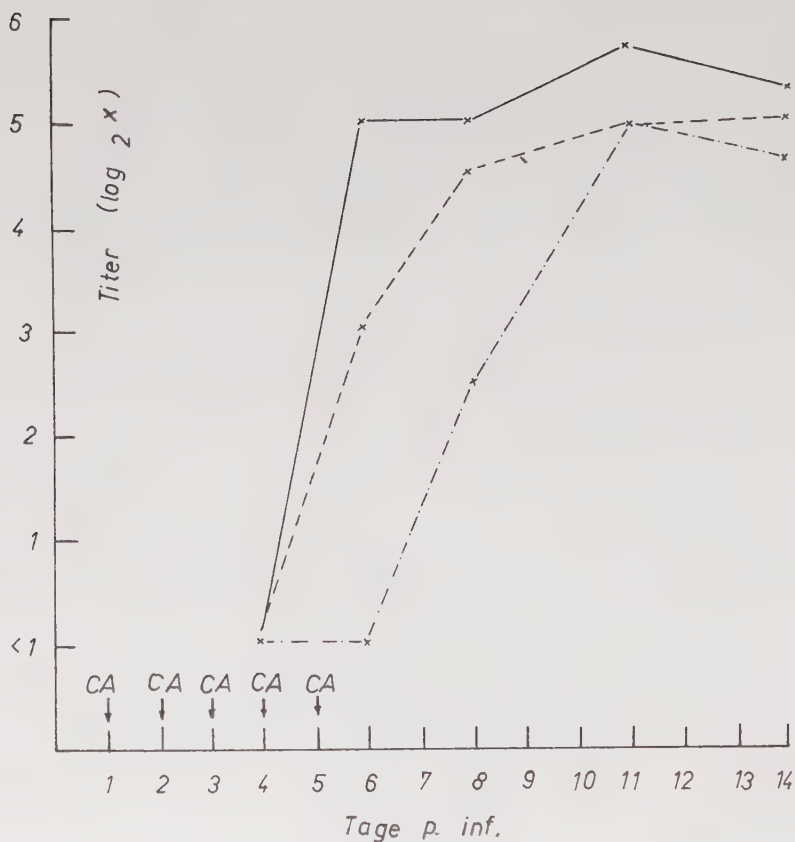
Einen Überblick der Untersuchungsergebnisse vermittelt Tabelle 3 und Abbildung 4. Unbehandelte Tiere erreichen nach Infektion mit MCMV am 6. Tag p.inf. Titerwerte, die sich im beobachteten Zeitraum von 14 Tagen nicht mehr wesentlich verändern. Alle behandelten Tiere erreichen nie die Titer der Kontrollen. Sie lagen immer darunter. Die Bildung komplementbindender Antikörper wird in den behandelten Gruppen deutlich vermindert.

Cytosinarabinosid in einer Dosis von 5×45 mg/kg bewirkt, daß selbst am 6. Tag p.inf. die Antikörper - bildung auf nicht nachweisbare Titer herabgesetzt ist. Tiere, die mit 5×30 mg/kg Cytosinara - binosid behandelt wurden, zeigen am 6. Tag p.inf. noch eine deutliche Verminderung der Antikörper - bildung. Sie erreichen am 8. Tag p.inf. Titer, die ungefähr den Kontrollen entsprechen, während die mit der höheren Dosis Cytosinarabinosid behandelten Tiere erst am 11. Tag p.inf. zu den Titerwerten der anderen Gruppen aufschließen.

Die Schwächung der Immunabwehr durch Cytosinarabinosid ist wiederum dosisabhängig. Etwa 4 - 6 Tage nach dem Absetzen des Medikaments ist an den Titern der komplementbindenden Antikörpern gegen Mäuse - cytomegalievirus keine immunsuppressive Wirkung mehr festzustellen.

Tage nach Immunisierung	Titer ($\log_2 x$)		
	Gruppe 1 (Kontrolle)	Gruppe 2 (5x30 mg/kg CA)	Gruppe 3 (5x45 mg/kg CA)
4	< 1	< 1	< 1
6	5,0	3,0	< 1
8	5,0	4,5	2,4
11	5,7	5,0	5,0
14	5,3	5,0	4,7

Tabelle 3. Titer der komplementbindenden Antikörper
bei Mäusen gegen Mäusecytomegalievirus
unter der Behandlung mit verschieden
hohen Dosen Cytosinarabinosid
(CA : Cytosinarabinosid)



Legende

- Gruppe 1 (Kontrolle)
- - - Gruppe 2 (5 x 30 mg/kg CA)
- · - Gruppe 3 (5 x 45 mg/kg CA)

Abbildung 4. Einfluß verschieden hoher Dosen Cytosin -
arabinsosid bei Mäusen auf die Bildung
komplementbindender Antikörper gegen
Mäusecytomegalievirus (CA : Cytosinarabinsosid)

3.3. Diskussion

BUTHALA (4) wies die virostatistische Wirkung von Cytosinarabinosid gegen eine Reihe von DNS-Viren in Zellkulturen nach. In vitro Untersuchungen von EMÖDI und VACI (8,34) bestätigten die anti - virale Aktivität auch gegen das Cytomegalievirus.

Die Versuche jedoch zeigen, daß Cytosinarabinosid im Tierexperiment keine virostatistischen Eigenschaften aufweist. Vielmehr wird die Immunabwehr dosisabhängig herabgesetzt. Die Antikörpertiter der behandelten Tiere blieben deutlich hinter den unbehandelten Tieren zurück. Durch die starke immunsuppressive Wirkung von Cytosinarabinosid kommt es zur Virusvermehrung. Die therapierten Tiere wiesen eine deutlich höhere Zahl von Viruspartikeln in der Leber auf.

Beim klinischen Einsatz von Cytosinarabinosid bei der Cytomegalie wird als ein Kriterium zur Beurteilung der Wirksamkeit die Virusausscheidung im Urin herangezogen. Es wäre denkbar, daß dadurch möglicherweise einige der unterschiedlichen Ergebnisse bedingt sind. So kann einerseits die Virurie sehr wechselnd sein und zum anderen werden 5 - 8 % Cytosinarabinosid unverändert im Urin ausgeschieden (14,33), die im direkten Einwirken eine virostatistische Aktivität entfalten könnten. Die Vermutung wird durch die Berichte von McCracken, EMÖDI und PLOTKIN (7,8,25) unterstützt. Sie beobachteten eine Reduzierung bis völliges Sistieren der Virurie, während sonstige klinische

Befunde unverändert bestehen blieben. Nach Absetzen von Cytosinarabinosid bzw. kurz darauf kam es zu einer ähnlich starken Virusausscheidung im Urin, wie sie vor Beginn der Therapie bestanden hatte.

Eine weitere Schwierigkeit zur Beurteilung der virostatistischen Aktivität von Cytosinarabinosid besteht darin, daß die geringe Fallzahl an den einzelnen Kliniken nur eine sehr begrenzte, statistisch gesicherte Aussage erlaubt. So schwankt die Zahl der Patienten, bei denen Cytosinarabinosid während einer Cytomegalie - Erkrankung eingesetzt wurde, in den verschiedenen Berichten zwischen 2, 3 und 4 (7,8,18,25).

Cytosinarabinosid wirkt beim Menschen ebenfalls stark immunsuppressiv und daher sind gewisse Vergleiche möglich. Es darf angenommen werden, daß auch beim Menschen die immunsuppressive Wirkung die Virusvermehrung beeinflußt, wie es in vielen Berichten bei zytostatischer Behandlung hervorgeht. Daher sollte die Anwendung von Cytosinarabinosid beim Menschen, wenn überhaupt, nur unter größter Vorsicht durchgeführt werden.

4. Zusammenfassung

Zur Behandlung von prognostisch ungünstigen Formen der connatalen Cytomegalie und der generalisierten Form der Cytomegalie-Infektion bei Patienten unter zytostatischer Therapie, wird Cytosinarabinosid empfohlen.

Zur Beurteilung der antiviralen Wirksamkeit von Cytosinarabinosid wurde es in verschiedenen hohen Dosen im Tierexperiment gegen Mäusecytomegalie - virus geprüft. Im einzelnen wurde die Anti - körperbildung, die Viruskonzentration in der Leber und die Mortalität von Mäusecytomegalie - virus-infizierten erwachsenen Mäusen unter Cytosinarabinosid-Behandlung bestimmt.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, daß Cytosin - arabinosid im Tierversuch keine virostatistische Wirkung aufweist. Vielmehr setzt Cytosinarabinosid im Tierversuch die Immunabwehr dosisabhängig herab, so daß es zu geringerer Antikörperbildung kommt. Die Viruskonzentrationen in der Leber ist je nach Dosis etwa 35 mal bzw. 80 mal größer als bei den unbehandelten Tieren. Die Mortalität beträgt bei den mit Cytosinarabinosid behandelten Tieren je nach Dosis 18 % bzw. 43 %, während von den unbehandelten Tieren etwa 4 % starben.

Cytosinarabinosid wirkt auch beim Menschen immun - suppressiv und es darf angenommen werden, daß es auch hier die Virusvermehrung beeinflußt. Daher sollte der Einsatz von Cytosinarabinosid beim Menschen, sofern man sich überhaupt dazu entschließt, nur unter größter Vorsicht durchgeführt werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Adler, F.L.

Studies on mouse antibodies. I. The response to sheep red cells.

J. Immunol. 95, 26 (1965)

2. Benyesh-Melnick, M., Vonka, V., Probstmeyer, F., Wimberly, I.

Human cytomegalovirus: properties of the complement-fixing antigen.

J. Immunol. 96, 261 (1966)

3. Brodsky, I., Rowe, W.P.

Chronic subclinical infection with mouse salivary gland virus.

Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 99, 654 (1958)

4. Buthala, D.A.

Cell culture studies on antiviral agents:

I. Action of cytosin arabinoside and some comparisons with 5-Jodo-2-deoxyuridine.

Proc. Soc. exp. Biol. 115, 69 (1964)

5. Chonchie, A.F., Barton, B.W., Tobin, J.O.H.

Congenital cytomegalovirus infection treated with idoxyuridine.

Brit. med. J. 162, VI (1968)

6. Chow, A.W., Foerster, J., Hryniuk, W.

Cytosine arabinoside therapy for Herpesvirus infections.

Antimicrob. Agents Chemother. 214 (1970)

7. McCracken, G.H., Luby, J.P.

Cytosine arabinoside in the treatment of congenital cytomegalic inclusion disease.

J. Pediat. 80, 488 (1972)

8. Emödi, G., Sartorius, J., Just, M., Rohner, F., Bühler, U.

Virus studies in the treatment of congenital cytomegalovirus infections by cytosine arabinoside.

Helv. paediat. Acta 27, 557 (1972)

9. Feigin, R.D., Shackelford, P. G., Vivo D.C.,
Haymond, M.W.
Floxuridine treatment of congenital cytomegalie
inclusion disease.
Pediatrics 48, 318 (1971)
10. Garabedian, G. A., Scott, L.V.
Plaqué assay for herpes simplex virus in
L-929 (Earle) mouse fibroblasts.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 126, 568 (1967)
11. Goldenberg, D. M., Biro, V., Elster, K., Schricker,
K., Sögtrop, H.
Laboratory studies on the pharmacology,
toxicology and antitumor action of cytosine
arabinoside.
Arzneimittel-Forschung 19. Beiheft 21 (1968)
12. Hall, T.C., Wilfert, C., Jaffe, N., Traggis, D.,
Dux, S., Pomph, P., Katz, S.
Treatment of varicella-zoster with Ara-C.
Clin. Res. 17, 470 (1969)
13. Henson, D., Smith, R.D., Gehrke, J.
Murine cytomegalovirus: observations on
growth in vitro, cytopathic effect and
inhibition with 5-iododeoxyuridine.
Arch. ges. Virusfor. 18, 433 (1966)
14. Ho, D.H.W., Frei, R.
Pharmacology studies of Ara-C in man.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 12, 92 (1971)
15. Hryniuk, W., Foerster, J., Majid, S., Chow, A.
Cytarabine for Herpesvirus infections.
J. Am. Med. Ass. 219, 715 (1972)
16. Juel-Jensen, B.E.
Varicella and cytosine arabinoside
Lancet 1, 572 (1970)

17. Juel-Jensen, B.E.

Severe generalized primary herpes treated
with cytosine arabinoside.
Brit. Med. J. 2, 154 (1970)

18. Kraybill, E.N., Sever, J.L., Avery, G.B.,
Movassaghi, N.

Experimental use of cytosine arabinoside in
congenital cytomegalovirus infection.
J. Pediat. 80, 485 (1972)

19. Krech, U.H., Jung, M., Jung, F.

Cytomegalovirus infections of man.
Basel-München-Paris-London-New York:
Karger S. 45, 84. (1971)

20. Krech, U.H., Jung, M.

Epidemiologie, Virologie und virologische
Diagnose der Cytomegalie.
Klin. Wschr. 51, 529 (1973)

21. Kwaan, H.C., McKelvey, E.M., Hajek, D.F.,
Bellmont, A.

Disseminated herpes zoster treated with
cytosine arabinoside.
Clin. Res. 17, 330 (1969)

22. Osborn, J.E., Medearis, D.N.

Studies of the relationship between mouse
cytomegalovirus and interferon.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 121, 819 (1966)

23. Peller, P., Goetz, O.

Immunsuppression und Cytomegalievirusinfektion.
Res. exp. Med. 162, 267 (1974)

24. Pierce, L.E., Jenkins, R.B.

Herpes zoster ophthalmicus treated
with cytarabine.
Arch. Ophthalm. 89, 21 (1973)

25. Plotkin, S.E., Stetler, H.

Treatment of congenital cytomegalic
inclusion disease with antiviral agents.
Antimicrob. Agents Chemother. 372 (1969)

26. Prager, D., Brader, M., Sawitzky, A.

Disseminated varicella in a patient with
acute myelogenous leukemia: Treatment
with cytosine arabinoside.
J. Pediat. 78, 321 (1971)

27. Rapp, F.

Inhibition by metabolic analogues of plaque
formation by herpes zoster and herpes
simplex viruses.
J. Immunol. 93, 643 (1964)

28. Reis, H.E., Brunsch, U., Schmidt, C.G.

Die Behandlung des Zoster mit Cytarabin.
Dtsch. med. Wschr. 98, 2293 (1973)

29. Seifert, G., Oehme, I.

Cytomegalie
In: Infektionskrankheiten Band I/1
Gsell - Mohr, Springer S. 735 (1967)

30. Seligman, B., Rosner, F.

Varicella and cytosine arabinoside.
Lancet 1, 367 (1970)

31. Sidiropoulos, D., Vasella, F., Schneider, H.J.,
Ferrazzini, F.

Zur Therapie der angeborenen Zytomegalievirus-
infektion.
Helv. paediat. Acta 26, 488 (1972)

32. Takatsy, G.

Use of spiral loops in serological
and virological micromethods.
Acta microbiol. Acad. Sci. Hung. 2, 191 (1955)

33. Talley, R.W., O'Brvan, R.M., Tucker, W.G.,
Loo, R.V.

Clinical pharmacology and human anti-
tumor activity of cytosine arabinoside.
Cancer (Philad.) 20, 809 (1967)

34. Váci, L., Gönczöl, E.

The effect of cytosine arabinoside on
the multiplication of cytomegalovirus
and on the formation of virus-induced
intracellular antigens.
Acta virol. 17, 189 (1973)

35. Wiesmann, E.

Medizinische Mikrobiologie
Thieme, Stuttgart, S. 305 (1971)

Lebenslauf

Am 20. März 1943 wurde ich als Sohn des Bauingenieurs Leonhard Rath und seiner Ehefrau Magdalena, geborene Pohl, in Reppen geboren.

Nach 5 Volksschulklassen in Pförring, trat ich 1954 in die Christoph-Scheiner-Oberrealschule in Ingolstadt ein und bestand dort 1963 die Reifeprüfung.

Von 1963 - 1965 leistete ich meinen Wehrdienst beim Bundesgrenzschutz ab.

Im Sommersemester 1965 nahm ich an der Universität München das Studium der Veterinärmedizin auf und schloß dieses 1970 mit dem Staatsexamen ab. Am 5.2.1971 promovierte ich mit einer virologischen Arbeit, die ich bei Prof. Dr. Mayr am Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Universität München erstellt hatte, zum Doktor der Tierheilkunde.

Nach vorübergehender Assistententätigkeit begann ich 1971 mit dem Studium der Humanmedizin, legte 1972 das humanmedizinische Physikum ab und werde im Frühjahr 1975 das medizinische Staatsexamen antreten.

